

**Fluoreszenzoptische Untersuchungen der
Phagozytoseeigenschaften neutrophiler Granulozyten
von Erwachsenen und Neugeborenen**

Wolfgang Forster

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER KINDERPOLIKLINIK DER UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. H. SPIESS

**Fluoreszenzoptische Untersuchungen der
Phagozytoseeigenschaften neutrophiler Granulozyten
von Erwachsenen und Neugeborenen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Forster

aus München

München 1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.H.J.SUSCHKE
Mitberichterstatter: Prof.Dr.H.SPIESS
Dekan: Prof.Dr.W.SPANN

Tag der mündlichen Prüfung:



Inhaltsverzeichnis

- I. Einleitung
- II. Problemstellung
- III. Eigene Untersuchungen
 - 1. Arbeitsmittel
 - 2. Probandengut
 - 3. Versuchsablauf
 - 4. Ergebnisberechnung
 - 5. Methodische Fehlerquellen
 - 6. Ergebnisse
 - 6.1. Verminderung der Zahl der Neutrophilen Granulozyten nach der Phagozytose
 - 6.2. Zeitpunkt der Degranulierung der Neutrophilen Granulozyten nach der Phagozytose
 - 6.3. Abhängigkeit der quantitativen Phagozytoseeigenschaften von der Größe des Bakterienangebots
 - 6.4. Phagozytoseeigenschaften des Neugeborenen
 - 6.5. Einfluß der Serumbestandteile auf die Phagozytose
- IV. Diskussion
- V. Zusammenfassung
- VI. Abkürzungen
- VII. Literaturnachweis
- VIII. Lebenslauf

I. Einleitung

Segmentkernige Neutrophile Granulozyten haben die Aufgabe, zur Infektabwehr des menschlichen Organismus beizutragen. Sie müssen in der Lage sein, Fremdstoffe, z.B. Bakterien zu erkennen, mit ihnen zu reagieren und sie abzutöten, sodaß schädliche Einwirkungen vermieden werden. Zusammen mit verschiedenen humoralen Faktoren bilden sie die unspezifische Abwehr des Organismus(12)(14). Diese Abwehr besteht darin, Krankheitskeime in sich aufzunehmen, zu phagozytieren und diese anschließend unschädlich zu machen, zu verdauen. Der Vorgang der Phagozytose bildet ein komplexes Geschehen welches man üblicherweise in sechs verschiedene Stadien unterteilt(12):

1. Chemotaxis

In das Gewebe eingedrungene Bakterien setzen Substanzen frei, die zusammen mit aus dem Gewebe selbst abgegebenen Stoffen einen chemotaktischen Reiz auf die Granulozyten und Monozyten ausüben. Dies führt zu einer Wanderung der Granulozyten aus den Gefäßen in das infizierte Gewebe in Form einer gerichteten Migration.

2. Opsonierung und Fixierung der Keime an die Granulozytenmembran

Bevor die Zelle die Bakterien in sich aufnehmen kann, werden diese zunächst an die Zellmembran angelagert. Dazu sind im Serum nachweisbare Substanzen notwendig, die als Opsonine bezeichnet werden. Der Vorgang der Opsonisierung scheint für die Phagozytose der Bakterien unabdingbare Voraussetzung zu sein.

3. Phagozytose

Die an der Membran fixierten Bakterien werden von Pseudopodien umschlossen. Gleichzeitig stülpt sich ein Teil der Membran nach innen und bildet eine Vakuole, genannt Phagosom. Ein Granulozyt ist in der Lage, zahlreiche Bakterien zu phagozytieren, wobei sowohl mehrere Bakterien in einer Vakuole liegen können, als auch eine Zelle mehrere Phagosome enthalten kann. Akute Entzündungen scheinen die Bildung von Vakuolen und die Ingestion von Partikeln zu stimulieren.

4. Degranulierung

Schon wenige Minuten nach der Ingestion der Bakterien lagern

sich neutrophile Granula an die Vakuolenmembran an, beide verschmelzen miteinander und der Inhalt der Granula ergießt sich in die Vakuole.

5. Abtötung der Bakterien

Während der Phagozytose werden eine Reihe von Stoffwechselschritten aktiviert, die letztlich zusammen mit dem Inhalt der Granula zur Abtötung der Bakterien führen. Im Elektronenmikroskop wird die Struktur der Bakterien aufgelockert, während gleichzeitig die Granula verschwinden.

6. Tod der Granulozyten

Im weiteren Verlauf folgt unabwendlich der Untergang der phagozytierenden Zellen. Die Vakuole wird undicht und entleert ihren Inhalt in den Granulozyten, der dadurch zerstört wird. Dieser Untergang führt dann erneut zur Freisetzung chemotaktisch wirkender Substanzen, was zur weiten Anlockung von Granulozyten führt.

II. Problemstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Vorgang der Phagozytose, was die Stadien 1-3 betrifft, quantitativ zu erfassen, um eine Methodik aufzustellen, mit der einerseits Unterschiede im Phagozytoseverhalten unter verschiedenen Voraussetzungen bestimmt werden können, andererseits mögliche Schäden im Phagozytoseverhalten und damit in der Infektabwehr erkannt werden können. Mit dieser Methodik wird dann der Unterschied der Phagozytose zwischen Erwachsenen und Neugeborenen untersucht.

III. Eigene Untersuchungen

1. Arbeitsmittel

Zur mikroskopischen Auswertung wird ein Fluoreszenzmikroskop verwendet, da es damit auf einfache Weise, fehlerfrei möglich ist, Bakterien intra- und extrazellulär zu erkennen und in verschiedene Verdauungsstadien einzuteilen(16). Die Identifizierung der Bakterien ist hier einwandfrei gewährleistet. Die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie sind von Keller ausführlich beschrieben(9).

Die Färbetechnik besteht analog anderen Arbeiten(8)(13)(16) aus einer Fixation mit Methanol(2 Min.) mit anschließender Färbung mit Pseudoisocyanin(30 Min.). Verwendet wird 500 μ molare PIC-Cl-Lösung, die mit Pufferlösung(Merck Art. 3460) pH 8,0 im Verhältnis 1:1 gemischt wird.

Als Substrat für die Phagozytose werden ausschließlich β -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe D (Enterokokken) verwendet, welche einer am Vortag des Versuchs angelegten 18^h-Trypticase-Bouillon entstammen(Susammensetzung: 100ml enthalten: Tryptisch verdautes Casein 17,0g, durch Papain verdautes Sojamehl 3,0g, NaCl 5,0g, K₂HPO₄ 2,5g, Traubenzucker 2,5g, pH ca. 7,3)

2. Probandengut

Die zentralen Themen dieser Arbeit sind die Untersuchung über die Abhängigkeit des Phagozytoseindex(es(u.)) von der Höhe des Bakterienangebots mit der darüber ermittelten Kurve, sowie der Unterschied zwischen Erwachsenen und Neugeborenen hinsichtlich dieser Kurve. Die Aufstellung dieser Kurve erfolgt zunächst mit dem Blut eines einzigen Probanden. Das Ergebnis wird anschließend mit 10 weiteren gesunden erwachsenen Probanden überprüft. Insgesamt liegen 123 Einzelergebnisse vor. Bei der Aufstellung des Diagramms bei Neugeborenen werden möglichst viele Werte im Parallelversuch ermittelt, um zur gleichen Zeit unter identischen Bedingungen möglichst viele vergleichbare Werte zu erhalten. Zu jeder Testreihe wird mindestens eine Kontrolle angefertigt(Bereits untersuchtes Probandengut, gesunde erwachsene Testperson), an Hand derer die Richtigkeit der Ergebnisse auf Grund von Übereinstimmung

mit vorigen Untersuchungen überprüft wird. Die Neugeborenen sind nicht älter als 14 Tage, es werden von insgesamt 15 neugeborenen Probanden 75 Einzelergebnisse ausgewertet.

3. Versuchsablauf

Zur Messung des Phagozytoseindex (Neutrophile Granulozyten mit intracellulären, phagozytierten Bakterien pro 100 Neutrophile Granulozyten) wird eine definierte Menge Blut mit einer definierten Menge Enterokokken-Bouillon auf Kunststoff-Inkubationsplatten (Inhalt pro Vertiefung 0,3 ml) bzw. in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Inhalt 1,5 ml) bei ca. 37°C inkubiert und dabei durchmischt. Die genauen Mengen finden sich in den jeweiligen Tabellen. Das Blut wird je nach Problemstellung bzw. Bedarf aus der Unterarmvene von erwachsenen Probanden oder aus der Ferse Neugeborener und, korrespondierend dazu aus der Zehe oder dem Finger Erwachsener (Kapillarblut) entnommen. Nach den jeweils angegebenen Zeiten werden Blutausstriche angefertigt und diese fixiert und gefärbt (s.o.). Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop, bestimmt wird der Phagozytoseindex (PI), d.h. die Zahl der Neutrophilen Granulozyten, die bereits phagozytiert haben in Prozent der Neutrophilen Granulozyten (NG). Die Versuche finden stets um die gleiche Tageszeit statt, wie auch die dazu benötigte Enterokokkenbouillon am Vortag um die gleiche Tageszeit beimpft wird. Zur Zählung der gezüchteten Enterokokken (EK) wird eine Probe der Bouillon verdünnt (1:100) und gut durchmischt (10 Min. im Rüttler). Mit dieser Verdünnung wird eine Zählkammer (Neubauer) gefüllt und in dieser die EK im Phasenkontrastmikroskop gezählt. Aus dem Ergebnis wird die EK-Konzentration der 18^h-Bouillon berechnet (Verdünnungsfaktor=100). Sie beträgt im Durchschnitt $4,0 \times 10^5$ EK/mm³.

4. Ergebnisberechnung

Gleichzeitig mit der Blutentnahme für den Phagozytoseindex wird Blut für eine Leukozytenzählung und ein Differentialblutbild entnommen. Die Fraktion der segmentkernigen Neutrophilen Granulozyten im Differentialblutbild und die der stabkernigen Neutrophilen Granulozyten wird zusammengefaßt als Neutrophile Granulozyten (NG) (Begründung s.u.). Aus dem prozentualen Anteil der Neutrophilen Granulozyten und der Zahl der Leukozyten pro mm³ errechnet sich die Zahl der Neutrophilen Granulozyten pro mm³.

$$\frac{(\text{Stab} + \text{Seg}) \times \text{Leuco}}{100} = \text{NG/mm}^3$$

Bei den Versuchen über die beiden zentralen Themen(s.o.) muß mit sehr kleinen Mengen Blut gearbeitet werden (100 mm^3), weil Neugeborenen die Abnahme einer größeren Menge nicht zugemutet werden soll. Da die dabei ermittelten Werte mit denen der erwachsenen Probanden verglichen werden, wird bei diesen genauso gearbeitet. Es werden pro Probe 100 mm^3 Blut in je eine Vertiefung der Inkubationsplatte (s.o.) pipettiert. Es sind somit 100 mal so viele NG wie in einem mm^3 , der vorher errechneten Zahl vorhanden. Bei anderen Versuchen erscheinen größere Mengen, die errechnete Zahl der NG pro mm^3 wird dann entsprechend der verwendeten Menge mit 1000 oder 1500 multipliziert. Die Inkubation findet dabei in Eppendorf-Reaktionsgefäßen statt.

Je nach Fragestellung wird zu diesem Blut eine bestimmte Menge EK-Bouillon pipettiert, woraus der Wert EK/Probe errechnet wird (pipettierte Menge in mm^3 mal ausgesetzte Menge EK/ mm^3).

Durch Division $\frac{\text{EK/Probe}}{\text{NG/Probe}}$ erhält man den Wert EK/NG, das Bakterienangebot pro Neutrophilem Granulozyt oder kurz Angebot.

Die Zeit, nach der die Ausstriche angefertigt werden beträgt hier 5, 10 und 15 Minuten. Teilt man den beim Mikroskopieren erhaltenen Wert für den Phagozytoseindex (PI) durch die Minuten, nach denen die Ausstriche gemacht wurden, so erhält man den Wert PI/min. Aus den so errechneten drei Werten (für jeweils 5, 10 und 15 Minuten) wird das arithmetische Mittel gebildet (durchschnittlicher PI/min), worauf in dieser Arbeit das Hauptgewicht gelegt werden soll.

Im Diagramm nach Linewater-Burk(s.u.) kommen dann die Reziprokwerte von EK/NG und durchschn. PI/min zur Anwendung, also $(\text{EK/NG})^{-1}$ und $(\text{PI/min})^{-1}$ bzw. NG/EK und min/PI.

5. Methodische Fehlerquellen

Die Analyse verschiedener Untersuchungsmethoden führt zu folgendem Ergebnis: die Testwerte sind nur vergleichbar, wenn exakt die gleiche Versuchsmethode angewandt wird.

Wichtig ist hier in erster Linie die Methode der Durchmischung bei der Inkubation der Bakterien und des Blutes. Ein Doppelversuch bei dem das Blut-Bakteriengemisch einerseits mit einem Rüttler durchmischt wurde, andererseits auf einem Taumeltisch stand ergab einen Unterschied von 57% (Rüttler: PI 74, Taumler PI 42). Im Rahmen dieser Arbeit kommen verschiedene Methoden zur Anwendung, es werden jedoch nur die Werte von jeweils gleichen Methoden miteinander verglichen. Bei der Untersuchung von Neugeborenenblut und der Untersuchung der Abhängigkeit des PI vom Angebot steht das Blut-EK-Gemisch auf einem Wärmeblock (37°C) und wird nach jeweils 5 Minuten mit einer Eppendorf-Pipette durchmischt, es wird das gesamte Volumen zweimal aufgesogen und wieder ausgeblasen.

Der Einfluß der Wärme spielt bei der Inkubation wohl eine geringere Rolle, wenn sich die Differenzen in gewissen Grenzen bewegen. Im Doppelversuch ergab sich bei Inkubation im Brutschrank ein Phagozytoseindex von 40 (Temperatur exakt 37°C), auf dem Wärmeblock ein PI von 42 (Temperatur leicht darunter). Der Einfluß einer Abkühlung des Blutes beim Transport von der Blutabnahmestelle zum Versuchsplatz konnte nicht festgestellt werden, genauso wenig ein Einfluß der Zeit zwischen Blutentnahme und Versuch. Diese Zeit war jedoch nie länger als 30 Minuten.

Zum Ausschluß der Fehler, die dadurch entstehen könnten, daß die Unterscheidung von Stabkernigen und Segmentkernigen Neutrophilen Granulozyten oft nicht eindeutig ist, zumal Differentialblutbild und Phagozytoseindex oft von verschiedenen Personen bestimmt werden (Diff. bb: meist MTA, PI: stets Doktorant oder wissenschaftl. Mitarbeiter), werden beide Fraktionen als Neutrophile Granulozyten zusammengefaßt. Die Untersuchungen in dieser Arbeit beziehen sich also auf beide Stadien der Entwicklung Neutrophiler Granulozyten. Sollte man annehmen,

daß Stabkernige Neutrophile Granulozyten weniger gut phagozytieren als Segmentkernige, so liegt dieser Fehler sicherlich unter der Meßgenauigkeit, wie es folgende Untersuchung zeigt: In 15 verschiedenen Präparaten wird der PI einerseits von Stabkernigen und Segmentkernigen NG bestimmt, andererseits nur von Segmentkernigen NG. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefaßt. Spalte 1 enthält die Nummer der angefertigten Präparate, Spalte 2 die Zahl derjenigen Segmentkernigen NG, welche nicht phagozytiert haben, Spalte 3 die Zahl derjenigen, welche intracellulär Bakterien aufweisen, Spalte 4 beinhaltet die Zahl derjenigen Stabkernigen NG ohne, Spalte 5 derjenigen mit phagozytierten Keimen. Die Zahlenangaben beziehen sich jeweils auf 100 Neutrophile Granulozyten (Jugendliche ausgenommen). Spalte 6 enthält den errechneten PI bezogen auf Segmentkernige und Stabkernige NG (Spalte 3 + Spalte 5), Spalte 7 den PI der sich ergeben würde, wenn nur segmentkernige NG gezählt werden:

$$\text{Spalte 3} \times \frac{100}{\text{Spalte 2} + \text{Spalte 5}}$$

Die Differenz zwischen den beiden verschiedenen Ergebnissen enthält Spalte 8. Die maximale Abweichung beträgt 3, die durchschnittliche Abweichung 1. Der Fehler ist somit vernachlässigbar.

Tab. 1: Auswertung verschiedener Präparate mit und ohne Einbeziehung der Stabkernigen Granulozyten zur Ermittlung der Phagozytoseindexes.

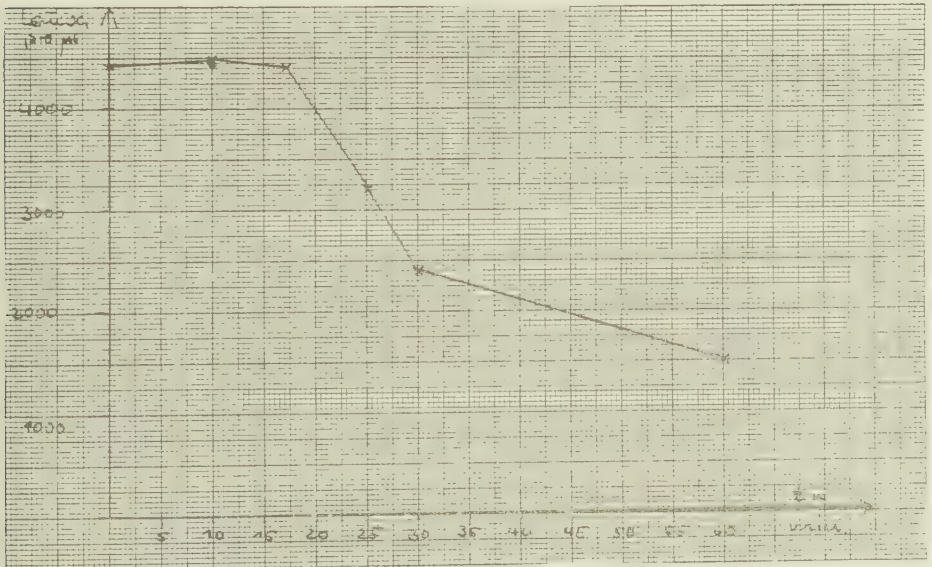
Präp. Nr.	Seg. NG		Stab NG		PI Seg+Stab	PI Seg	Abweichung
	ohne EK	mit EK	ohne EK	mit EK			
1	81	3	14	2	5	4	1
2	85	6	7	2	8	7	1
3	73	11	14	2	13	13	0
4	73	9	17	1	10	11	1
5	66	13	19	2	15	16	1
6	73	17	8	2	19	19	0
7	86	5	8	2	7	5	2
8	75	14	9	2	16	16	0
9	59	35	3	3	38	37	1
10	84	8	8	0	8	9	1
11	67	21	10	2	23	24	1
12	52	38	7	3	41	42	1
13	66	11	25	3	14	14	0
14	51	20	24	5	25	28	3
15	47	25	23	6	31	34	3

6. Ergebnisse

6.1. Verminderung der Zahl der Neutrophilen Granulozyten nach der Phagozytose

Während einer Inkubation einer größeren Menge Blutes mit EK wird die Leucozytenabnahme mittels einer Zählkammer (Neubauer) aus kleinen Proben des Inkubationsgemisches gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 grafisch dargestellt. Die Abszisse stellt die Zeit dar, nach der die Kammer jeweils gefüllt wird, die Ordinate die Zahl der Leucozyten pro mm^3 .

Abb. 1: Abnahme der Leucozytenzahl bei der Inkubation mit EK.



Zur genauen Untersuchung wird eine Messreihe angelegt, die in Korrelation zur Zeit das Verhältnis zwischen NG und Lymphozyten mißt. Dieses Verhältnis wird im genauen Differentialblutbild ermittelt (mindestens 200 ausgewertete Zellen) und in Prozent angegeben ($\frac{\text{Zahl der NG}}{\text{Zahl der Ly}} \times 100$). Setzt man dann die so zur Zeit t_0 ermittelte Zahl (0 Minuten, d.h. Ausgangswert) gleich 100 Prozent, so errechnen sich die übrigen Werte (t_x) nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Zahl der NG zur Zeit } t_x}{\text{Zahl der Lympho zur Zeit } t_x} \times 100$$

$$\times 100 =$$

$$\frac{\text{Zahl der NG zur Zeit } t_o}{\text{Zahl der Lympho zur Zeit } t_o} \times 100$$

$$NG_{t_x} \times L_{t_o} \times 100$$

$$L_{t_x} \times NG_{t_o}$$

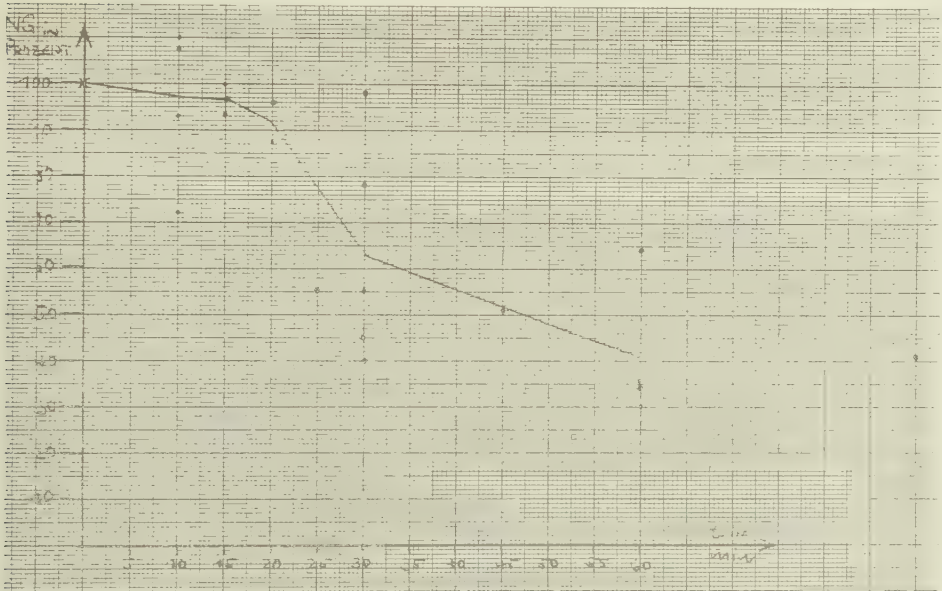
Tab.2: Abnahme der NG bei Inkubation mit EK

Probe	Zeit in Minuten										
Nr.	0	10	15	20	25	30	45	60	90	180	
1	100	93		96		45		64	41	28	
2	100	108	97	87	55	55	51	30			
3	100	72				78		34			
4	100					40		35			
5	100	110				98		40			
Durchschnitt	100	97		92		63		41			

Trägt man diese prozentuale Abnahme der Zahl der NG in Abhängigkeit von der Zeit grafisch auf, so gelangt man zu einer Kurve, die ähnlich aussieht wie Abb.1.

Bei der Kurve in Abb.2 handelt es sich um die arithmetischen Mittelwerte der Einzeldaten der obigen Tabelle(siehe auch letzte Zeile).

Abb.2: Abnahme der NG bei Inkubation mit EK.



6.2. Zeitpunkt der Degranulierung der Neutrophilen Granulozyten nach der Phagozytose

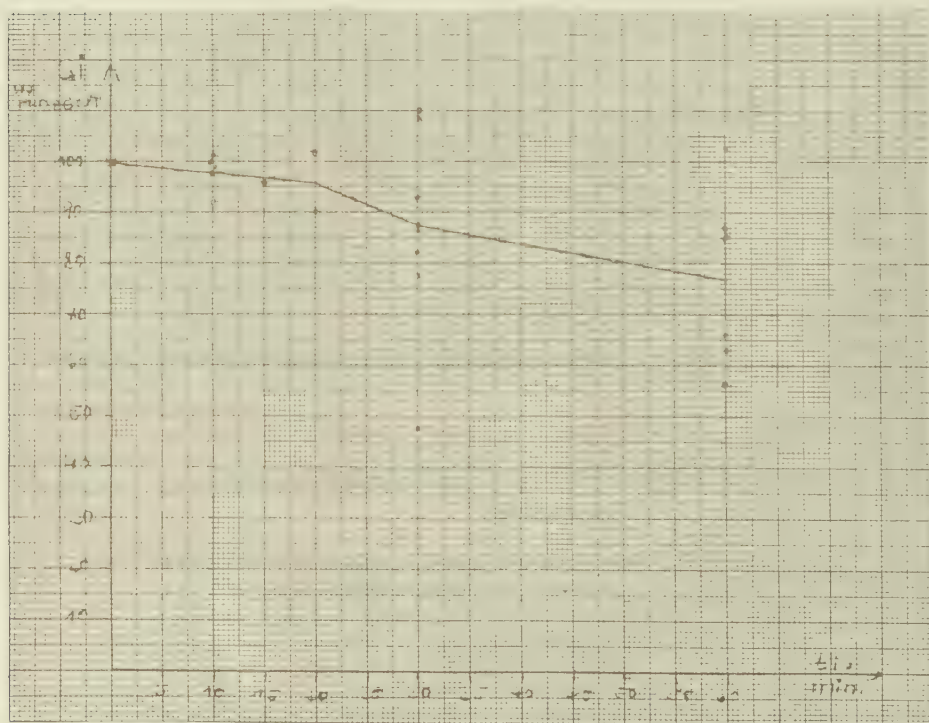
Um den Fehler zu vermeiden, der dadurch entsteht, daß Bakterien nach der Phagozytose verschwinden (siehe Einleitung) muß die Zeit der Inkubation kurz genug gewählt werden. Dazu wird eine

Versuchsreihe aufgestellt, die den Granulationsindex (NG mit Granula pro 100 NG) in Abhängigkeit von der Zeit mißt. Der Wert zur Zeit t_0 wird gleich 100 Prozent gesetzt, die Werte zur Zeit t_x errechnen sich nach der Formel:

$$\frac{GI_{t_x}}{GI_{t_0}} \times 100$$

Die Abnahme des Granulationsindex ist in Abb. 3 grafisch aufgetragen. Bei der Kurve handelt es sich um Mittelwerte der Einzeldaten, welche als Punkte dargestellt sind. Die Zahl der Probanden beträgt 8.

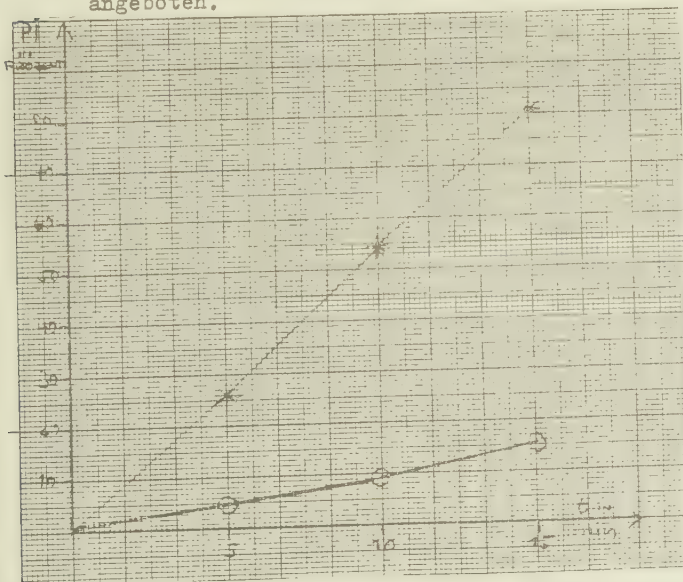
Abb. 3: Abnahme des PI bei Inkubation mit EK



6.3. Abhängigkeit der quantitativen Phagozytoseeigenschaften von der Größe des Bakterienangebots

Faßt man die Phagozytose als Leistung auf, die sich pro Zeiteinheit darstellt, so ergibt sich die Größe Phagozytoseindex pro Minute (PI/min), d.h. die Zahl der NG, welche in einer Minute als bisher unaktive Zellen phagozytieren. Die Zahlenangabe bezieht sich auf 100 NG. Trägt man in einer Reaktionsgrafik in der Abszisse die Zeit auf, nach der die Ausstriche jeweils angefertigt werden und in der Ordinate die jeweiligen Phagozytoseindizes, so ergibt sich annähernd eine Gerade. Voraussetzung ist, daß die Werte nicht über 15 Min. liegen (siehe oben). Diese Gerade hat die charakteristische Steigung PI/min. Die sich in Abb. 4 darlegende unterschiedliche Steigung ist auf ein unterschiedliches Bakterienangebot zurückzuführen, da alle übrigen Daten identisch sind. Es handelt sich hierbei um einen Doppelversuch mit einerseits 7 EK/NG, andererseits 138 EK/NG. Die Werte des kleinen Angebots sind durch Kreise, die des großen Angebots durch Sterne symbolisiert.

Abb. 4: PI bei verschiedenen Bakterienangeboten.



Ziel dieser Untersuchung ist es, den Zusammenhang zwischen Bakterienangebot(EK/NG) und durchschnittlichem PI/min zu klären. Zunächst wird die Berechnung des jeweiligen Angebots dargestellt, wobei in den Tabellen die erste Spalte die Nummer des jeweiligen Probanden(alle gesund, erwachsen) enthält. In der zweiten Spalte befindet sich die im Phasenkontrastmikroskop ausgezählte Bakterienkonzentration pro mm^3 18ⁿ-Bouillon. Die angegebene Zahl ist mit 10^5 zu multiplizieren. Die dritte Spalte enthält die im Differentialblutbild ermittelten Anteile der Neutrophilen Granulozyten(Seg + Stab) an der Gesamtzahl der Leucozyten. Aus Spalte 3 und Spalte 4 errechnet sich die Zahl der NG pro mm^3 Blut(Spalte 5). Diese Zahl, multipliziert mit der pipettierten Menge in mm^3 (100) ergibt die Zahl der NG pro Probe(Spalte 6). Diese Zahl ist ebenfalls mit 10^5 zu multiplizieren. Spalte 7 beinhaltet die Menge Bakterienbouillon in mm^3 , welche jeweils vor der Inkubation zupipettiert wird, diese Zahl, multipliziert mit der EK-Konzentration(Spalte 2) ergibt die Zahl der EK pro Probe(Spalte 8). Diese Zahl dividiert durch die in Spalte 6 angegebene NG-Menge ergibt dann das jeweilige Angebot EK/NG(Spalte 9).

Tab.3:Berechnung des Verhältnisses von EK und NG für die jeweiligen Proben erwachsener Probanden

Proband	EK/ mm^3	Leuco	NG in	NG/ mm^3	NG pro	mm^3 EK	EK pro	EK/NG
Nr.	Bouillon	pro	%		Probe	pro	Probe	
	$\times 10^5$	mm^3			$\times 10^5$	Probe	$\times 10^5$	
		Blut						
1	4,5	5700	66	3760	3,8	5	22,5	7
						10	45	14
						15	67,5	21
						20	90	28
						25	112,5	35
						30	135	42
						40	180	55
						50	225	69
						60	270	83
						100	450	138
						200	900	277
						300	1350	415

Proband Nr.	EK/mm ³ Bouillon x 10 ⁵	Leuco pro mm ³ Blut	NG in %	NG/mm ³	NG pro Probe x 10 ⁵	mm ³ EK pro Probe	EK pro Probe x 10 ⁵	EK/NG
1	23	5700	66	3760	3,8	10	230	61
1	"	"	"	"	"	200	4600	1223
1	4,0	5000	49	2450	2,5	5	20	8
1	"	"	"	"	"	100	400	163
2	6,0	4300	51	2193	2,2	10	60	27
2	"	"	"	"	"	15	90	41
2	"	"	"	"	"	20	120	55
2	"	"	"	"	"	25	150	68
2	"	"	"	"	"	40	240	109
2	"	"	"	"	"	50	300	136
2	"	"	"	"	"	100	600	273
3	3,9	5500	46	2500	2,5	20	78	31
3	4,6	5500	46	2500	2,5	20	92	37
4	3,8	4700	49	2300	2,3	50	190	83
4	"	"	"	"	"	100	380	165
5	"	6300	47	3960	4,0	50	190	48
5	"	"	"	"	"	100	380	95
6	"	2800	36	1008	1,0	50	190	190
6	"	"	"	"	"	100	380	380
7	4,2	8000	36	2900	2,9	100	420	145
7	"	"	"	"	"	150	630	217
8	"	5500	43	2370	2,4	100	420	175
8	"	"	"	"	"	150	630	263
9	"	5900	60	3540	3,5	100	420	120
9	"	"	"	"	"	150	630	180
10	2,4	8150	75	6100	6,1	100	240	4
10	"	"	"	"	"	500	1200	20
11	3,2	6300	60	3780	3,8	20	65	17
11	"	"	"	"	"	100	320	85

Die nun folgende Tabelle enthält die Berechnung des durchschnittlichen Phagozytoseindex pro Minute. In der ersten Spalte sind wiederum die Nummern der Probanden aufgeführt, in der zweiten Spalte die vorher berechneten Werte für EK/NG. Die dritte Spalte enthält die Reziprokwerte der Spalte 2, also $(EK/NG)^{-1}$ oder NG/EK. Die Spalten 4 bis 6 beinhalten den im Fluoreszenzmikroskop ermittelten Wert des PI. Dieser Wert wird durch die Anzahl der Minuten geteilt und aus den so ermittelten drei Ergebnissen wird das arithmetische Mittel gebildet (Spalte 7). Die Formel dafür lautet:

$$\frac{PI_1}{5} + \frac{PI_2}{10} + \frac{PI_3}{15}$$

3

Die letzte Spalte enthält den Reziprokwert von Spalte 7.

Tab. 4: Ermittlung des durchschnittlichen PI/min für verschiedene Bakterienangebote.

Proband Nr.	EK/NG	NG/EK	PI nach 5' 10' 15'	durchschn. PI/min	min/PI
1	7	0,143	4 9 16	0,9	1,11
1	14	0,071	6 17 27	1,5	0,64
1	21	0,048	10 22 34	2,2	0,47
1	28	0,036	13 22 44	2,6	0,39
1	35	0,029	16 30 40	3,0	0,33
1	42	0,024	20 30 54	3,3	0,30
1	55	0,018	20 46 59	3,9	0,26
1	69	0,015	24 44 56	4,3	0,23
1	83	0,012	20 50 74	4,6	0,22
1	138	0,007	26 54 80	5,3	0,19
1	415	0,002	31 67 99	6,5	0,15
1	277	0,004	29 64 85	6,1	0,17

Proband Nr.	EK/NG	NG/EK	PI nach 5' 10' 15'	durchschn. min/PI PI/min	
1	61	0,016	20 41 56	3,9	0,26
1	1223	0,001	32 70 90	6,5	0,15
1	8	0,122	6 10 23	1,2	0,83
1	163	0,006	22 49 80	4,9	0,20
2	27	0,037	7 30 50	2,6	0,39
2	41	0,024	20 36 50	3,6	0,28
2	55	0,018	22 36 50	3,8	0,26
2	68	0,015	20 40 64	4,1	0,24
2	109	0,009	24 50 70	4,8	0,21
2	136	0,007	28 52 70	5,2	0,19
2	273	0,004	34 60 80	6,0	0,17
3	31	0,032	14 26 40	2,7	0,37
3	37	0,027	17 33 50	3,3	0,30
4	83	0,012	21 44 58	4,2	0,24
4	165	0,006	25 50 70	4,9	0,20
5	48	0,021	20 40 62	4,0	0,25
5	95	0,011	26 50 74	5,0	0,20
6	190	0,005	25 52 69	4,9	0,20
6	380	0,003	25 50 80	5,1	0,20
7	145	0,007	19 40 75	4,3	0,23
7	217	0,005	25 50 80	5,1	0,20
8	175	0,006	16 52 79	4,6	0,22
8	263	0,004	30 55 83	5,7	0,18
9	120	0,008	17 50 56	4,0	0,25
9	180	0,006	25 53 80	5,2	0,19
10	4	0,250	7 13 30	1,4	0,71
10	20	0,050	9 20 34	2,0	0,50
11	17	0,059	5 29 36	2,1	0,476
11	85	0,012	32 39 50	4,5	0,222

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb.5 grafisch dargestellt. In der Abszisse befinden sich die Werte für das jeweilige Angebot, in der Ordinate die Werte für PI/min. die Punkte stellen die Einzelergebnisse dar, die Kurve ist auf Grund ihrer reziproken Darstellung (Mittelwert in Abb.6) mathematisch berechnet:

Darstellung einer Geraden (Abb.6): $a + b x'$, wobei $a = 0,17$
und $b = 6,2$

Daraus reziproke Darstellung (Abb.5), wobei gilt $y' = \frac{1}{y}$
und $x' = \frac{1}{x}$:

$$y' = \frac{x'}{ax' + b} \quad \text{oder} \quad y' = \frac{x'}{0,17 x' + 6,2}$$

Der Wert PI/min nimmt mit steigendem Angebot zu bis zu einem charakteristischen Maximum, der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit $V_{\max}$. In Anlehnung an die Enzymkinetik nenne ich das Bakterienangebot (Substratkonzentration), bei dem eine halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit auftritt Michaeliskonstante K_m .

Trägt man nun die Meßergebnisse nicht wie in Abb.5 auf, sondern mit reziproker x- und y-Achse, so gelangt man analog der Enzymkinetik zu einer Geraden (Lineweaver-Burk). In der Ordinate befindet sich hier der Wert $(EK/NG)^{-1}$ oder NG/EK , in der Abszisse der Wert $(PI/min)^{-1}$ oder min/PI . Der Schnittpunkt mit der y-Achse, derjenige Wert, für den $x' = 0$, also $(EK/NG)^{-1} = 0$, d.h. EK/NG als unendlich angenommen wird, stellt somit den Reziprokwert der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit dar. Der Schnittpunkt mit der x-Achse stellt analog der Enzymkinetik den Wert $-\frac{1}{K_m}$ dar. Daraus errechnet sich eine Michaeliskonstante von 36^m .

Der getönte Bereich um die Mittelwertgerade stellt die Streubreite dar, die bei den Messungen auftrat (Abb.6).

Abb.5: Darstellung der Abhängigkeit des
PI/min vom Bakterienangebot

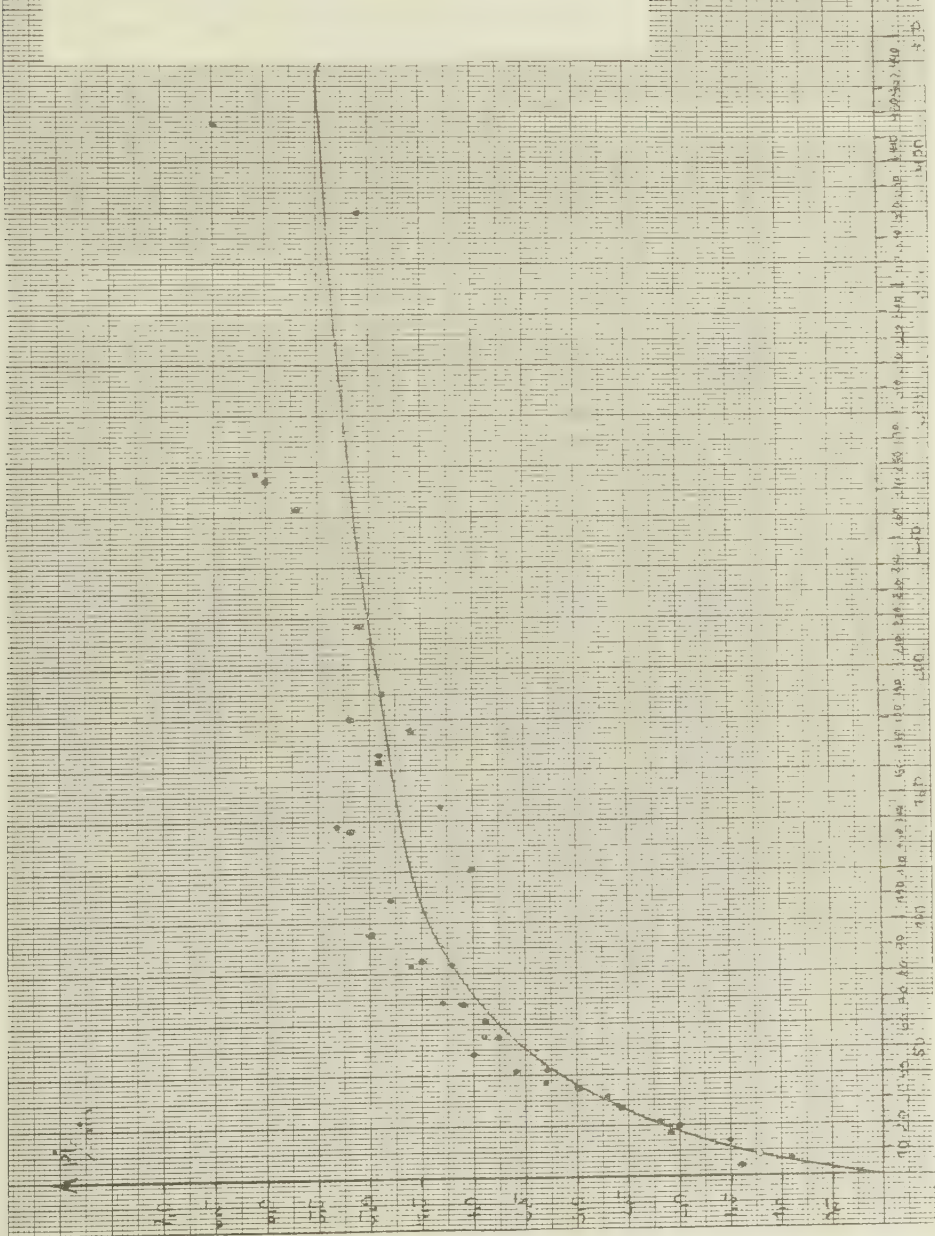
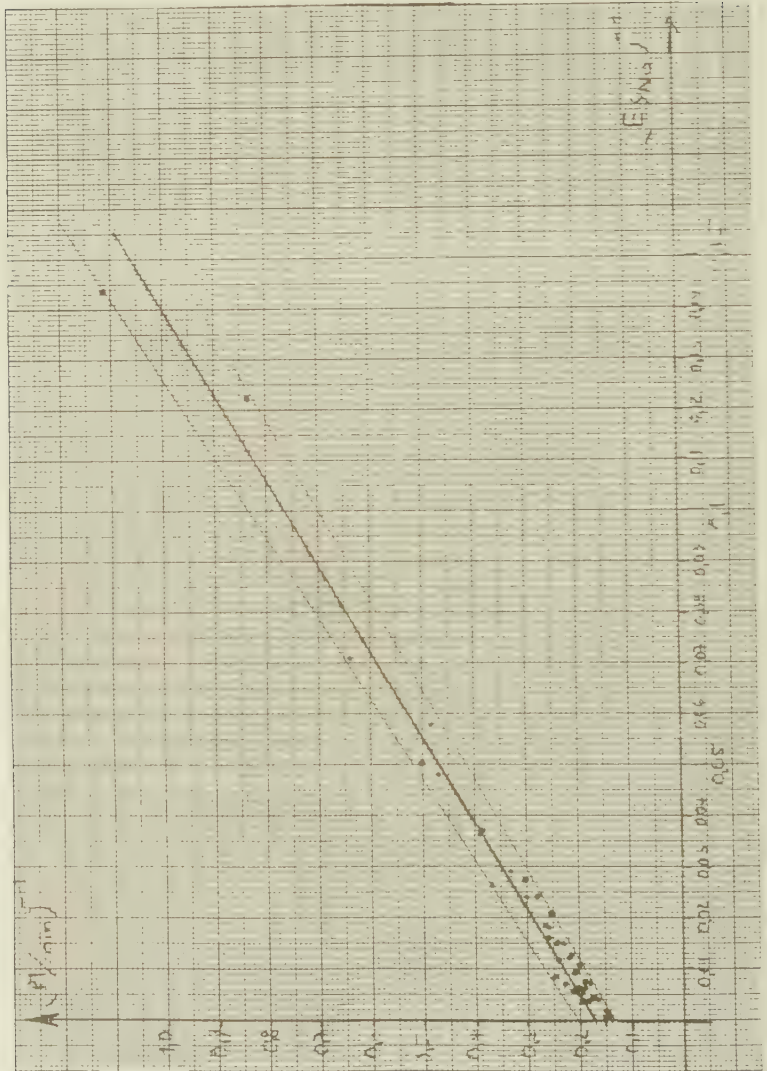


Abb.6: Darstellung der Abhängigkeit des PI/min vom Bakterienangebot mit reziproken Achsen.



6.4. Phagozytoseeigenschaften des Neugeborenen

Anhand des oben beschriebenen Phagozytostests soll hier das Problem untersucht werden, ob die Granulozyten Neugeborener Unterschiede im Phagozytoseverhalten gegenüber denen Erwachsener aufweisen. Analog den Untersuchungen der Ziffer 6.3. wird das Blut neugeborener Kinder getestet, wobei zu jeder Testreihe eine Kontrolle mit Erwachsenenblut (K) angefertigt wird. Die Tabellen sind auf die gleiche Weise angelegt wie unter 6.3. beschrieben.

Tab.5: Berechnung des Verhältnisses von EK und NG für die jeweiligen Proben von neugeborenen Probanden und Kontrollen.

Proband Nr.	EK/mm ³ Bouillon x 10 ⁵	Leuco pro mm ³ Blut	NG in %	NG/mm ³	NG pro Probe x 10 ⁵	mm ³ EK pro Probe	EK pro Probe x 10 ⁵	EK/NG
K	4,0	5000	49	2450	2,5	5	20	8
K	"	"	"	"	"	100	400	163
1	"	9100	30	2730	2,7	5	20	7
1	"	"	"	"	"	100	400	147
2	"	14800	80	11840	11,8	100	400	34
3	"	8600	43	3700	3,7	100	400	108
K	23	5700	66	3760	3,8	10	230	61
K	"	"	"	"	"	200	4600	1223
4	"	14800	80	11840	11,8	10	230	19
4	"	"	"	"	"	200	4600	389
K	3,9	5500	46	2500	2,5	20	78	31
5	"	7300	31	2263	2,3	20	78	34
5	"	"	"	"	"	50	195	85
6	"	6500	38	2470	2,5	20	78	31
6	"	"	"	"	"	50	195	78
7	"	10500	31	3260	3,3	20	78	24
7	"	"	"	"	"	50	195	59
K	4,6	5500	46	2500	2,5	20	92	37
8	"	15100	79	11900	11,9	50	230	19
K	3,8	4700	49	2300	2,3	50	190	83
K	"	"	"	"	"	100	380	165
9	"	10800	36	3890	3,9	50	190	49
9	"	"	"	"	"	100	380	97
10	"	10100	69	6570	6,6	50	190	29
11	"	10000	37	3700	3,7	50	190	51

Proband Nr.	EK/mm ³ Bouillon x 10 ⁵	Leuco pro mm ³ Blut	NG in % Blut	NG/mm ³	NG pro Probe x 10 ⁵	mm ³ EK pro Probe	EK pro Probe x 10 ⁵	EK/NG
11	3,8	10000	37	3700	3,7	100	380	103
12	"	12375	43	5260	5,3	50	190	36
K	4,2	8000	36	2900	2,9	100	420	145
K	"	5500	43	2370	2,4	100	420	175
13	"	17600	62	10900	10,9	100	420	39
13	"	"	"	"	"	150	630	58
14	"	13200	35	4600	4,6	100	420	91
14	"	"	"	"	"	150	630	137
15	"	10800	36	3900	3,9	100	420	108
15	"	"	"	"	"	150	630	162

Tab.6: Ermittlung des durchschnittlichen PI/min bei verschiedenen Bakterienangeboten bei der Untersuchung Neugeborener und Erwachsener(K).

Proband Nr.	EK/NG	NG/EK	PI nach 5' 10' 15'	durchschn. min/PI PI/min
K	8	0,122	6 10 23	1,2 0,83
K	163	0,006	22 49 80	4,9 0,20
1	7	0,137	2 6 6	0,5 2,00
1	147	0,007	20 28 45	3,3 0,30
2	34	0,029	6 12 22	1,3 0,77
3	108	0,009	20 38 50	3,7 0,27
K	61	0,016	20 41 56	3,9 0,26
K	1223	0,001	32 70 90	6,5 0,15
4	19	0,053	3 10 16	0,9 1,11
4	389	0,003	28 42 67	4,8 0,21
K	31	0,032	14 26 40	2,7 0,37
5	34	0,029	6 14 24	1,4 0,71
5	85	0,012	11 20 22	1,9 0,53
6	31	0,032	6 12 20	1,2 0,83
6	78	0,013	11 20 40	2,3 0,44
7	24	0,042	6 9 25	1,2 0,83
7	59	0,017	9 21 30	2,0 0,50
K	37	0,027	17 33 50	3,3 0,30

Proband Nr.	EK/NG	NG/EK	PI nach 5' 10' 15'			durchschn. min/PI PI/min	
8	19	0,052	7	4	7	0,8	1,25
K	83	0,012	21	44	58	4,2	0,24
K	165	0,006	25	50	70	4,9	0,20
9	49	0,020	7	17	30	1,7	0,59
9	97	0,010	12	20	33	2,2	0,46
10	29	0,034	6	14	22	1,4	0,73
11	51	0,020	8	20	21	1,7	0,59
11	103	0,010	15	22	50	2,8	0,36
12	36	0,028	11	15	20	1,5	0,67
K	145	0,007	19	40	75	4,3	0,23
K	175	0,006	16	52	79	4,6	0,22
13	39	0,026	5	8	13	0,9	1,11
13	58	0,017	10	15	19	1,6	0,63
14	91	0,011	11	16	38	2,1	0,48
14	137	0,007	8	23	41	2,2	0,46
15	108	0,009	14	25	31	2,5	0,40
15	162	0,006	17	29	35	2,9	0,34

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind in Abb.7 grafisch aufgetragen.Das Diagramm entspricht exakt dem oben beschriebenen(III.6.3./Abb.5).Das Ergebnis der vorherigen Untersuchung (Erwachsene) ist als Linie(Kontrolle) eingezeichnet,die Test-ergebnisse über Neugeborene sind mit Punkten dargestellt, die Mittelwertkurve ist wie oben ausgeführt berechnet.

Abb.7: Darstellung der Abhängigkeit des PI/min von EK/NG bei Neugeborenen und Erwachsenen(Kontrolle).

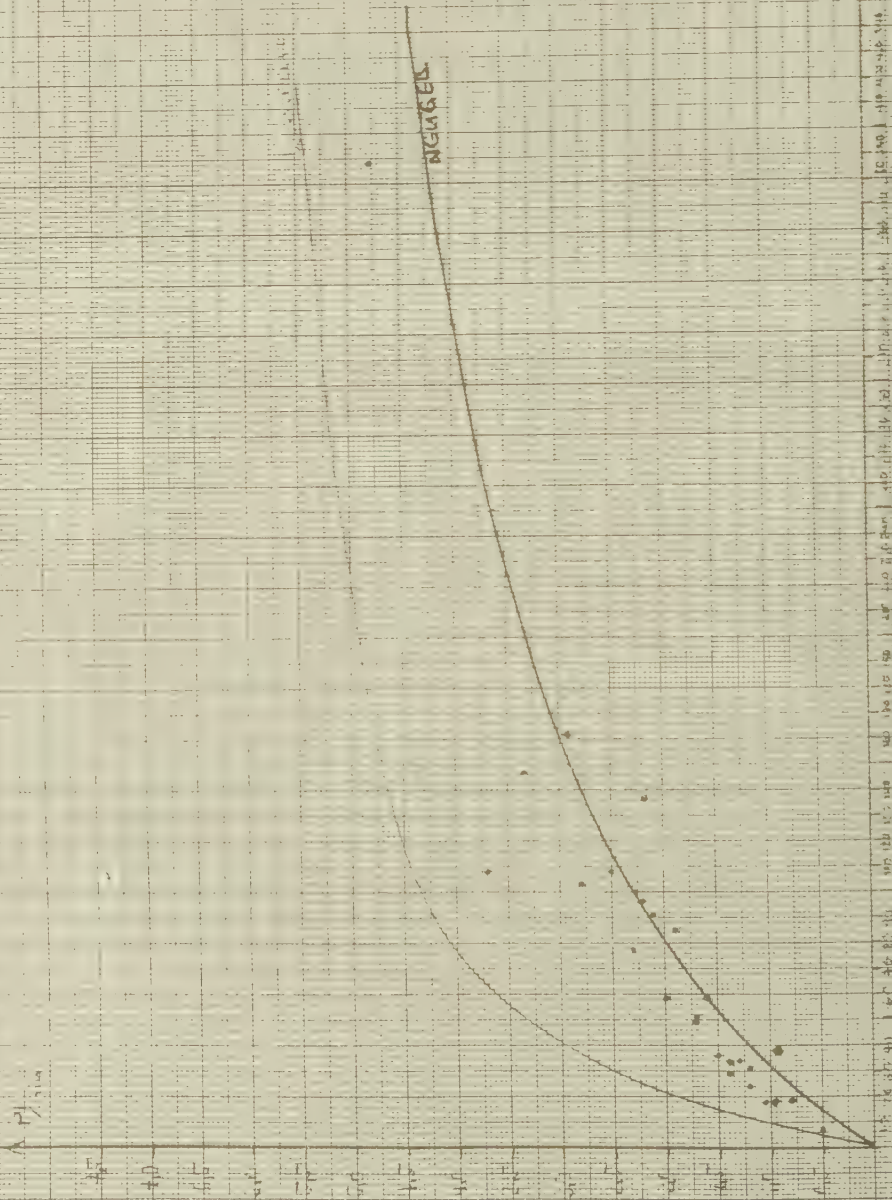


Abb.8:Darstellung der Abhängigkeit des PI/min von EK/NG
mit reziproken Achsen bei Neugeborenen und Erwachsenen.

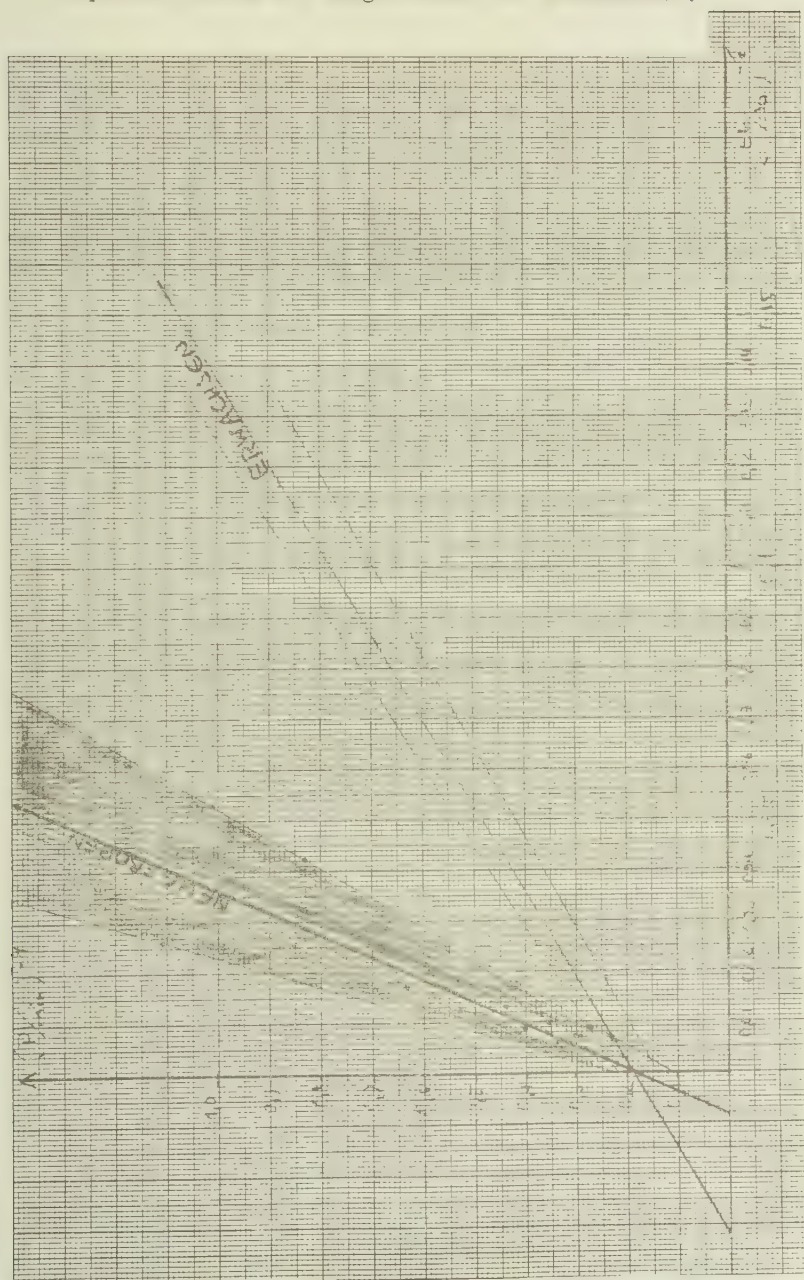
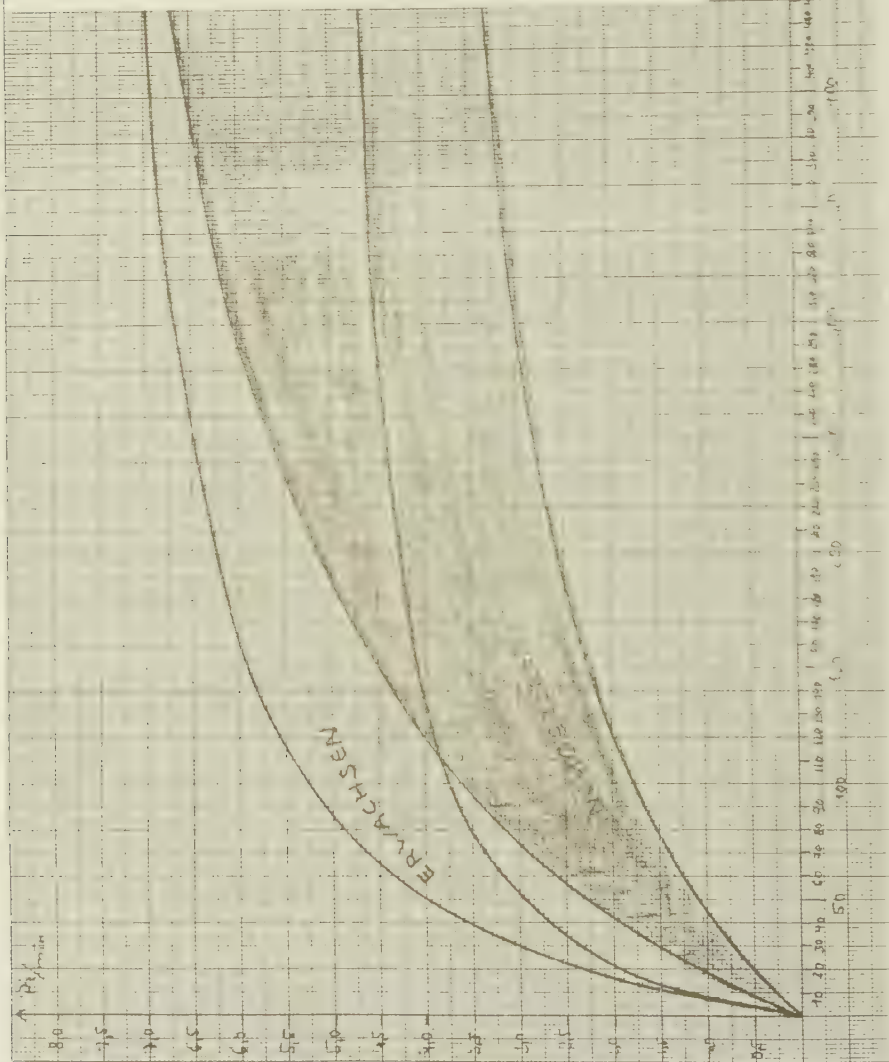


Abb.9: Darstellung der Streubreite bei der Abhängigkeitskurve des PI/min von EK/NG bei Erwachsenen und Neugeborenen.



Das Ergebnis zeigt einen deutlich flacheren Kurvenverlauf, was schlechtere Phagozytosefähigkeit bedeutet. Jedoch nähert sich mit zunehmenden x -Werten die Kurve derjenigen der Erwachsenen. Trägt man die ermittelten Daten in das Linewater-Burk-Diagramm ein, so ergibt sich das Bild einer Geraden, welche steiler verläuft als die der Erwachsenen (Kontrolle), diese aber in der y -Achse schneidet, mit anderen Worten das exakte Bild einer kompetitiven Hemmung (Abb. 3). Die getönten Bereiche um die Mittelwertkurve symbolisieren die Streubreite der Testergebnisse. Diese Streubreite wird auf die "Michaelis"-Kurve zurückübertragen (Abb. 9). Es zeigt sich deutlich, daß bis zu einem Angebot von 110 EK/NG keine Überlappung der Ergebnisse vorliegt. Bei hohem Angebot (ab 400) werden beide Kurven nahezu identisch (Abb. 9).

Die Berechnung der Mittelwertkurve in Abb. 7 erfolgt analog IV.2.:

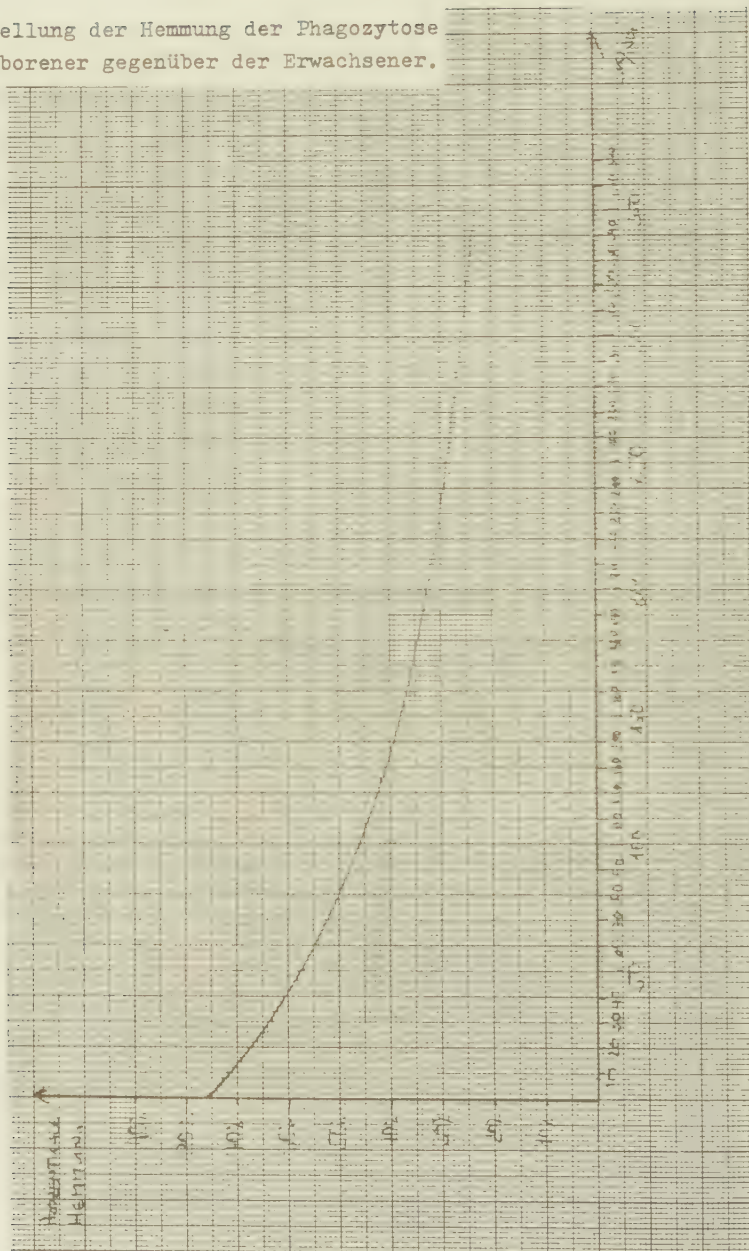
Darstellung der Geraden (Abb. 8): $a + bx$ mit $a=0,17$ und $b=26$.
Daraus reziproke Darstellung (Fig. 7), wobei $y' = \frac{1}{y}$ und $x' = \frac{1}{x}$:

$$y' = \frac{x'}{ax' + b} \quad \text{oder} \quad y' = \frac{x'}{0,17 x' + 26} \quad .$$

Zur Veranschaulichung wird die Phagozytosehemmung in Prozent gegen das Bakterienangebot aufgetragen, wobei sich die Hemmung nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Hemmung} = 100 - \frac{\text{PI/min}_{\text{neugeb.}}}{\text{PI/min}_{\text{erwachs.}}} \times 100$$

Abb.10: Darstellung der Hemmung der Phagozytose
Neugeborener gegenüber der Erwachsener.



6.5. Einfluß der Serumbestandteile auf die Phagozytose

Die Untersuchung hat ergeben, daß Erwachsene und Kinder (Neugeborene) in der Phagozytose charakteristische Unterschiede aufweisen (Erläuterung mit Diagrammen siehe IV. Diskussion). Es stellt sich hierbei die Frage, diese Unterschiede auf die Unterschiede in den Serumbestandteilen zurückzuführen. Deshalb werden Doppelversuche angelegt, in denen Blut in größeren Mengen zentrifugiert wird (ca. 5 ml). Es werden sodann die zellulären Bestandteile vom größten Teil des Serums getrennt. Dieses Serum wird einerseits wieder zugegeben (Kontrolle), andererseits wird in gleicher Menge Kochsalz zupipettiert. Danach wird die Phagozytose mit den zuvor beschriebenen Tests gemessen, jedoch nicht mit Mikromengen; die Inkubation findet in Eppendorf-Reaktionsgefäßen statt, die Menge beträgt dabei ca. 1,5 ml. Gemischt wird mittels eines Rüttlers.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. Die prozentuale Hemmung ist dabei nach folgender Formel berechnet:

$$\left(100 - \frac{\text{PI/min}_{\text{Neug.}}}{\text{PI/min}_{\text{Erw.}}} \times 100 \right) \%$$

Tab.7:Ermittlung der prozentualen Hemmung der Phagozytose
durch Abzentrifugation des größten Teils des Serums

Proband Nr.	Pi nach 5' 10' 15'	durchschn. PI/min	prozentuale Hemmung
1 K	7 13 30	1,4	43 %
1 P	3 8 15	0,8	
2 K	9 20 34	2,0	60 %
2 P	6 6 8	0,8	
3 K	5 29 36	2,1	52 %
3 P	5 9 16	1,0	
4 K	32 39 50	4,5	47 %
4 P	12 20 40	2,4	
5 K	27 71 79	5,9	5 %
5 P	18 72 88	5,6	
6 K	72 93 98	10,0	18 %
6 P	47 91 93	8,2	
7 K	46 66 68	6,8	9 %
7 P	36 67 72	6,2	
8 K	78 90 87	10,1	8 %
8 P	64 91 88	9,3	
9 K	88 98 100	11,4	20 %
9 P	59 89 97	9,1	
10 K	54 79 92	8,3	23 %
10 P	40 65 72	6,4	

IV. Diskussion

Der physiologische Vorgang der Phagozytose beinhaltet Fehlerquellen, die die Genauigkeit der Arbeit beeinträchtigen könnten. Deshalb werden Vorversuche angelegt, die diese Einflüsse genauer untersuchen sollen. Die Verminderung der Zahl der Neutrophilen Granulozyten erfolgt auf Grund der Tatsache, daß sie ihrerseits von anderen Neutrophilen Granulozyten phagozytiert werden (siehe Einleitung). Durch das Verschwinden dieser Zellen entsteht bei der Auswertung der Präparate ein methodischer Fehler, da NG, welche bereits phagozytiert haben, in der Differentialzählung nicht mitgerechnet werden. Beim Mikroskopieren ergibt sich tatsächlich häufig das Bild eines Konglomerats, das aus NG, Teilen von NG, Trümmern bis kaum sichtbaren Resten, sowie aus Bakterien, intakten NG, Monozyten und Lymphozyten besteht. Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, zu welchem Zeitpunkt nach der Phagozytose das Sterben der NG einsetzt, sodaß die Zahl so vermindert wird, daß das Testergebnis beeinflusst wird.

Im ersten Teil des ersten Versuchs wird diese Verminderung direkt mit einer Zählkammer gemessen. Der Kurvenverlauf weist einen Knick auf bei ca. 17 Minuten nach Inkubationsbeginn, d.h. nach etwa 17 Minuten beginnt bei einem zahlenmäßig erfaßbaren Teil der NG der Untergang. Der zweite Teil des Versuchs soll dieses Ergebnis nochmals kontrollieren. Es wird in Korrelation zur Zeit das Verhältnis zwischen NG und Lymphozyten gemessen. Die Halbwertszeit der Lymphozyten ist bedeutend höher als die der Granulozyten, welche auch unter physiologischen Umständen nicht höher als 6-7 Stunden beträgt (14). In den hier zur Diskussion stehenden Zeiträumen kann man die Zahl der Lymphozyten als konstant annehmen. Gibt man nun die Zahl der NG im genauen Differentialblutbild (mindestens 200 ausgezählte Zellen) als Relativzahl der Lymphozyten an ($\frac{\text{Zahl der NG}}{\text{Zahl der Ly}} \times 100$), so erhält man ein relatives Maß für die Menge der NG im Blut.

Das Ergebnis des zweiten Teils des Versuchs bestätigt das des ersten Teils, es zeigt, daß die Zahl der NG 15 Minuten nach Beginn der Inkubation anfängt abzunehmen; eine starke Abnahme setzt nach 20 min. ein. Ergebnis dieser Untersuchung ist die Forderung, für genaue Phagozytoseuntersuchungen nur Werte bis 15 Minuten heranzuziehen, um nicht einen methodischen Fehler einzugehen, da der wahre Wert des PI bei 30 Minuten schon um ca. 30 %, bei 60 Minuten um ca. 120 % höher liegen würde als der gemessene Wert (siehe III.6.1. Abb. 2).

Eine andere Quelle für Ungenauigkeiten ist die Tatsache, daß Bakterien, welche phagozytiert sind, verdaut werden; sie verlieren ihre charakteristische Färbung (Fluoreszenzmikroskopie) und werden schließlich unsichtbar (8) (16) (eigene Beobachtungen). Stellt man den Zeitpunkt der nach der Phagozytose einsetzenden Degranulierung fest, welche nach der Ingestion, aber noch vor der Verdauung der Bakterien einsetzt (siehe Einleitung), so kann man Rückschlüsse auf den Zeitpunkt deren Verschwindens ziehen. Der Versuch III.6.2. zeigt, daß eine zahlenmäßig relevante Degranulierung erst nach 20 Min. einsetzt. Da das Verschwinden der Bakterien logischerweise aber erst nach der Degranulierung erfolgt, wird ein methodischer Fehler, der dadurch entstehen könnte, daß NG, welche unsichtbare Bakterien enthalten, so gezählt werden, als hätten sie nicht phagozytiert, dadurch vermieden, daß Werte über 20 Minuten nicht berücksichtigt werden. Dies ist ohnehin der Fall (IV.1.1.).

Die Größe des Phagozytoseindex ist somit nicht nur von der Zeit abhängig, sondern auch vom jeweiligen Bakterienangebot. Bei niedrigem Angebot zeigt sich im Mikroskop folgendes Bild:

Fast alle Keime befinden sich innerhalb der Granulozyten, extracellulär sind nur wenige vorhanden. Somit ist die Höhe der Phagozytose durch die Tatsache beschränkt, daß nicht genug Substrat (Bakterien) vorhanden ist: PI/min sinkt. Bei sehr großem Angebot dagegen befinden sich in unmittelbarer Nähe jeder phagozytosefähigen Zelle ausreichend viele Bakterien. Der Wert PI/min ist hier nur mehr abhängig von der Fähigkeit, daß der Granulozyt möglichst schnell phagozytieren kann. Bestätigt wird dies durch die Ergebnisse von C. Eschenbach et al., der einen Anstieg des Ingestionsindex (Phagozytierte Bakterien pro 100 NG) in Abhängigkeit von verschiedenen Bakterienangeboten (10-60 Bakt./NG) unter verschiedenen Umständen beobachtet (2). Hier soll nun der Zusammenhang zwischen Bakterienangebot und PI/min geklärt werden.

In III.6.3. wurde für die Abhängigkeit der Phagozytose vom Bakterienangebot ein charakteristischer Kurvenverlauf ermittelt (Abb. 5). Aus diesem, sowie, einfacher und eindeutiger aus dessen reziproker Auftragsweise (Abb. 6) kann sowohl ein bestimmter Wert für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt werden, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit bei theoretisch unendlich hohem Bakterienangebot, als auch ein bestimmter Wert für die "Michaeliskonstante". Nimmt man unendliches Angebot an, so kann man sich vorstellen, daß die Bakterien in solch unmittelbarer Nachbarschaft zu den NG liegen, daß sich diese weder darauf zubewegen (Taxiskomponente/siehe Einleitung Stadium 1) noch diese mit viel Aufwand festhalten (Opsonisierung/Einleitung Stadium 2) müssen. Der Wert V_{max} ist somit nur von der Phagozytoseleistung im engsten Sinn, d.h. der reinen Einverleibung (Stadium 3) abhängig. Der Schnittpunkt mit der x-Achse stellt analog der Enzymkinetik den Wert $-\frac{1}{K}$ dar. Daraus errechnet sich eine Michaeliskonstante von 36. Dieser K_m Wert stellt in der Enzymkinetik ein Maß für die Affinität des Enzyms zum jeweiligen Substrat dar. Er ist unabhängig von der Menge des Enzyms wie auch der des Substrats. In unserem Fall ist er also ein Maß für die "Affinität" des NG zum EK, also ein Charakteristikum für die Fähigkeit des NG, ein bestimmtes Bakterium zu erreichen (Taxis/Stadium 1) und es an die Zellwand zu fixieren (Opsonisierung/

Stadium 2). Die eigentliche Phagozytose drückt sich dann in $V_{\max}$ aus (s.o.). Will man also die Phagozytose im engsten Sinn (Stadium 3) untersuchen, wobei Chemotaxis und Opsonisierung vernachlässigt werden sollen, so hat dies bei Substratsättigung zu erfolgen, d.h. die EK-Angebote müssen so hoch sein, daß die "Michaeliskurve" (Abb. 5) annähernd waagrecht verläuft. Die Enzymdiagnostik fordert $10 \times K_m$. Diese Untersuchungsweise hätte den Vorteil, daß Ungenauigkeiten, welche bei der Bestimmung des EK-Angebotes auftreten, z.B. bei der Keimzählung nicht zum tragen kämen. Nachdem aber in der Medizin bei den meisten Phagozytoseuntersuchungen alle Komponenten der zellulären Infektabwehr von Interesse sind, muß man mit verschiedenen Angeboten arbeiten, um annähernd den ganzen Kurvenverlauf umreißen zu können.

Die Phagozytose bzw. Opsonisierung und Fixierung der Bakterien an die Granulozytenmembran wird durch bestimmte Antikörper und aktiviertes Komplement (C_{3b}) ausgelöst. Komplement kann einerseits durch nicht-immunologische Faktoren aktiviert werden wie bakterielle Oberflächen, Lipopolysaccharide o.ä., andererseits durch immunologische Faktoren, durch IgM oder IgG nach Bindung an ein Antigen (12)(14). Eine Reihe von Krankheiten korreliert statistisch signifikant mit IgA-Mangel, z.B. Infektionen der oberen Luftwege, Autoimmunerkrankungen, Durchfallerkrankungen. Die Verbindung von IgA-Mangel und Infektionen der oberen Luftwege wird bei etwa 1/3 der Patienten beobachtet (1). IgM-Mangel ist meist korreliert mit IgA-Mangel. Selektiver IgM-Mangel hat bei den betroffenen Patienten zu rezidivierenden schweren Infektionen wie Meningokokkensepsis oder Pseudomonas-Infektion geführt (3).

IgA und IgM werden nicht durch die Placenta transportiert (6). Obwohl das Neugeborene normale Lymphozytenzahlen besitzt, fehlen Antikörperbildende B-Zellen. IgM und IgG werden vom Neugeborenen nur in Spuren gebildet, ein bei der Geburt erhöhter IgM-Spiegel spricht für eine pränatale Infektion (4)(15)(5). IgG dagegen ist placentargängig, die IgG-Werte des Kindes entsprechen denen der Mutter (15). Pränatale Infekte werden meist mit Leih-Antikörpern bekämpft (5).

Aus diesen Fakten, den Tatsachen, daß zur Phagozytose bestimmte Antikörper nötig sind, das Kind diese aber noch nicht in ausreichender Menge hat, ließe sich folgern, daß die Phagozytosefähigkeit des Neugeborenen und damit seine Resistenz gegen Krankheitserreger erniedrigt sein müßte. Tatsächlich berichten verschiedene Autoren von geringerer Abwehrkraft und erniedrigter Phagozytosefähigkeit (17) (7). Andere geben an, daß die Phagozytose sowohl im mütterlichen Blut als auch im Nabelschnurblut Neugeborener gegenüber der erwachsenen Vergleichspersonen erhöht ist (11).

Anhand des oben beschriebenen Phagozytostests soll hier dieses Problem untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen (III. 6.4.) sind in Abb. 7 grafisch aufgetragen. Das Diagramm entspricht exakt dem oben beschriebenen (III. 6.3./Abb. 5). Das Ergebnis der vorherigen Untersuchung (Erwachsene) ist als Linie (kontrolle) eingezeichnet, die Testergebnisse über Neugeborene sind mit Punkten dargestellt, die Mittelwertkurve ist berechnet (siehe oben).

Kompetitive Hemmung bedeutet in der Enzymkinetik eine Hemmung in der Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes, wobei die enzymatische Reaktion selbst unbeeinflusst bleibt: $V_{\max}$ bleibt gleich, K_m steigt. Exakt diese Verhältnisse liegen auch hier vor: K_m bei den Untersuchungen von Neugeborenen ist gegenüber dem bei Erwachsenen gemessenem K_m erhöht, $V_{\max}$ stimmt überein. Das Zustandekommen des Enzym-Substrat-Komplexes, also die Anlagerung des Substrates an das Enzym bedeutet in unserem Fall aber nichts anderes als Opsonisierung und Fixation, Enzymreaktion nichts anderes als Phagozytose. Nachdem sich die Phagozytose im engen Sinn in $V_{\max}$ ausdrückt (s.o.), läßt sich folgern, daß Neugeborene genauso gut phagozytieren können wie Erwachsene. Es zeigt sich aber eine Erhöhung des Wertes K_m , d.h. die Opsonisierung und bzw. oder die Fixation ist erschwert. Die Tatsache, daß Neugeborene in ihrem Blut weder IgM noch IgA besitzen, dies aber zur Opsonisierung wichtig ist (s.o.) könnte diese Ergebnisse durchaus erklären.

Der hyperbole Verlauf der sich hierbei ergebenden Kurve (Abb. 10) läßt folgern, daß die Hemmung bei unendlich großem Angebot unendlich klein ist, eine Tatsache, die durchaus einleuchtet, wenn man sich vorstellt, daß Bakterien sich auch ohne Granulozytenbewegung und Opsonisierung an deren Membran anlagern, wenn sie in hypotetisch unendlich hoher Konzentration in dem betreffenden Medium vorhanden sind. Der Unterschied im Blut Erwachsener und Neugeborener ist also in diesem Fall bedeutungslos. Bei sehr kleinem Angebot dagegen wird der Unterschied sehr groß, die Hemmung ist extrem hoch. Hier sind sowenige Keime vorhanden, daß sich der einzelne Granulozyt erheblich bewegen muß um diese zu erreichen, außerdem muß er opsonieren, fixieren, Pseudopodien bilden etc., damit sich das Bakterium nicht wieder fortbewegt. Hier ist der Unterschied zwischen Erwachsenen und Neugeborenen enorm.

Die Unterschiede im Phagozytoseverhalten zwischen Neugeborenen und Erwachsenen wurden in dieser Arbeit auf den Einfluß humoraler Blutbestandteile zurückgeführt. Um diesen Einfluß nochmals zu beschreiben werden nun mehrere Doppelversuche angelegt, in denen die Phagozytose einerseits unter Entfernung des größten Teils des Serums, andererseits unter Wieder-Zugabe dieses Serums nach der Zentrifugation gemessen wird (III. 6.5.).

Die Abhängigkeit vom Bakterienangebot soll hier unberücksichtigt bleiben. Man muß sich darüber im klaren sein, daß dieser Versuch nicht genaue Daten liefern kann, nachdem weder das gesamte Serum abzentrifugiert wird, noch ein konstantes Verhältnis zwischen Serum und korpuskulösen Blutbestandteilen eingehalten werden kann (unterschiedl. HK). Mehrmaliges Zentrifugieren würde zwar in dieser Hinsicht bessere Ergebnisse liefern, die Leukozyten würden jedoch stark geschädigt werden, wie Vorversuche gezeigt haben. Bei den untersuchten 10 Probanden ergab sich eine Phagozytosehemmung von durchschnittlich 28 % mit einer Schwankungsbreite von 5 bis 60 %. Es handelt sich jedoch auf jeden Fall eindeutig um eine z.T. sogar erhebliche Hemmung der Phagozytose, was dieser Versuch auch nur beschreiben wollte. Sinn dieses Versuchs ist es nicht, die vorher beschriebene Hemmung genau zu erfassen, was bei der Komplexität der Ursachen wohl auf so einfache Weise auch nicht möglich ist. Sinn dieses Versuchs ist lediglich, zur Beschreibung der Wichtigkeit humoraler Blutbestandteile beim Phagozytosegeschehen beizutragen.

V. Zusammenfassung

Um den genauen Zusammenhang zwischen Bakterienangebot pro phagozytischer Blutzelle (Hier Neutrophiler Granulozyt) und Phagozytoseindex (Granulozyt mit intracellulären, phagozytierten Keimen) zu klären, wurden Versuchsserien mit steigender Bakterienzahl angelegt. Es wurden nach jeweils 5, 10 und 15 Minuten Inkubation Blutaussstriche angefertigt und dann diese unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet; bestimmt wurde der Phagozytoseindex. Es stellte sich heraus, daß dieser mit steigendem Angebot zunimmt bis zu einem bestimmten Maximalwert. Die Ergebnisse wurden in ein Diagramm eingetragen, in dem die Abszisse die Bakterienmenge pro Granulozyt, die Ordinate den Wert PI/min (Phagozytoseindex geteilt durch die Inkubationszeit) darstellt. Der Wert PI/min stellt somit das Mittel aus drei Einzelwerten dar. Es hat sich gezeigt, daß die Kurve in reziproker Auftragsweise (Abszisse: NG/EK , Ordinate: min/PI) eine Gerade ergibt.

Nach Aufstellung dieses Diagrammes wurde die gleiche Studie mit dem Blut neugeborener Kinder durchgeführt. Das Ergebnis weist einen flacheren Kurvenverlauf auf, was den Bereich des niedrigen Bakterienangebots betrifft. Bei höher werdendem Angebot nähert sich die Kurve immer mehr der der Erwachsenen. In der reziproken Auftragsweise ergibt sich ebenfalls eine Gerade. Diese verläuft steiler als die der Erwachsenen und schneidet diese in der y-Achse.

Die Interpretation dieser Ergebnisse führt zu der Meinung, daß die Granulozyten Neugeborener gleich gut phagozytieren können wie die Erwachsener, was das Stadium 3 angeht (Ingestion). Eine gravierende Beeinträchtigung weisen sie jedoch in der Fähigkeit auf, zu opsonisieren und sich auf die Bakterien zuzubewegen (Stadium 1 + 2). Diese Phagozytoseeigenschaften werden zurückgeführt auf den physiologischen Mangel an bestimmten humoralen Stoffen, die zur Phagozytose nötig sind.

VI. Abkürzungen

EK = Enterokokken = β -hämolysierende Streptokokken der Gruppe D =
Streptokokkus faecalis

NG = Neutrophiler Granulozyt

PI = Phagozytoseindex = NG mit phagozytierten EK pro 100 NG

PI/min = PI geteilt durch die Zeit der Inkubation in Minuten

GI = Granulationsindex = NG mit Granula pro 100 NG

$V_{\max}$ = maximale Reaktionsgeschwindigkeit, hier maximaler PI/min

K_m = Michaeliskonstante = diejenige Konzentration, bei der halb-
maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, hier das
Ek-Angebot, bei dem die Hälfte von $V_{\max}$ erreicht wird

VII. Literaturnachweis

1. Ammann, A.J., Hong, R.: Selective IgA-deficiency; Presentation of 30 cases and a review of literature, *Medicine* (Baltimore) 50, 223 (1971)
2. Eschenbach, C., Büdenberger, B.: Ingestions- und NBT-Reduktionskapazität neutrophiler Granulozyten bei Trisomie 21, *Klin. Wschr.* 54, 1147-1151 (1976)
3. Faulk, W.P., Kiyasu, W.S., Cooper, M.D., Fudenberg, H.H.: Deficiency of IgM, *Pediatrics* 47, 399 (1971)
4. Fischer, K., Seelemann, K.: Infektionskrankheiten, *Kinderheilkunde* (G.A. van Harnack), 149-161 (Springer-Verlag 1974)
5. Ganong, W.F.: Immun-Mechanismen, *Physiologie*, 452-462 (Springer-Verlag 1974)
6. Gitlin, D., Rosen, F.S., Michael, J.G.: Transient 19 S-gamma₁-globulin-deficiency in the newborn infant and its significance, *Pediatrics* 31, 197 (1963)
7. Gotoff, S.P., Behrman, R.E.: Neonatal septicemia, *J. Pediatr.* 76, 142 (1970)
8. Böhmer, H.: Diss. in Vorbereitung, UNI München
9. Keller, W.M.: Vergleichende fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Blut- und Knochenmarksausstrichen von Kindern, Diss. UNI München (1975)
10. Koch, C.: Neutrophil granulocyte funktion in vitro, *Acta path. microbiol. scand. Section B*, 82, 127-135 (1974)
11. Müller-Lissner, S., Eschenbach, C., Vieham, E.: Nitroblau-Tetrazolium-Reduktionskapazität neutrophiler Granulozyten im Nabelschnurblut und im Blut Gebärender, *Klin. Wschr.* 54, 1153-1155 (1976)
12. Niethammer, D., Wildfeuer, A., Kleihauer, E., Haferkamp, C.: Granulozytendysfunktion I, *Klin. Wschr.* 53, 643-652 (1975)
und
Granulozytendysfunktion II, *Klin. Wschr.* 53, 739-746 (1975)
13. Pöhlmann, R.: Diss. in Vorbereitung, UNI München

14. Resch, K.: Das Immunsystem, Internist 18, 233-247 (1977)
15. Salfner, B.: Primäre Defektimmunopathien, Internist 18, 248-254, (1977)
16. Schleich, A.: Fluoreszenzoptische Untersuchungen bei der Phagozytose von Enterokokken durch segmentkernige Neutrophile Granulozyten, Diss. UNI München (1978)
17. Schröter, W.: Neugeborenenpathologie, Kinderheilkunde (G.A. van Harnack) 21-57 (Springer-Verlag 1974)

VIII. Lebenslauf

Ich wurde am 5.9.1952 in München als Sohn des Dr.med.Erich Forster und seiner Frau Dr.phil.Anneliese Forster,geb.Schwab geboren.Von 1958 bis 1962 besuchte ich die Volksschule Grünwald,danach das Albert-Einstein-Gymnasium in München(neusprachliche Richtung),in dem ich nach neunjähriger Schulzeit 1971 das Abitur ablegte.Da es schon sehr lange mein Wunsch war, Medizin zu studieren,bewarb ich mich nach der Reifeprüfung um einen Studienplatz für dieses Fach,bekam aber eine Ablehnung. Es folgten weitere 6 erfolglose Bewerbungen(bis Wintersemester 1974/75).In dieser Zeit studierte ich in Hinblick auf ein künftiges Medizinstudium Allgemeine Naturwissenschaften,Rechte und Physik.Vom 15.4.74 bis 15.4.75 leistete ich das"Freiwillige Soziale Jahr"ab.Für das Sommersemester 1975 bekam ich eine Zulassung für das Medizinstudium an der Universität München. Von meinen früheren Studien wurde mir ein Jahr angerechnet und ich begann das Studium im dritten Semester.Nach dem Wintersemester 75/76 legte ich das Physikum ab,nach dem Wintersemester 76/77 den ersten Teil des Staatsexamens.Im Frühjahr 79 werde ich mich für den zweiten Teil des Staatsexamens anmelden. Ich beabsichtige,nach Ablegung der restlichen Examina und des Praktischen Jahres,eine Weiterbildung zum Facharzt zu beginnen.

Ich danke Herrn Prof.Dr.med.H.J.Suschke für die Überlassung des Themas sowie für die ständige Beratung und Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herrn Prof.Dr.med.H.Spiess danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ich danke Frau Rode und Herrn Dr.Wilhelm für ihre freundliche Mitarbeit und ihre Beratung.

Außerdem gilt mein Dank allen Medizinisch-Technischen-Assistenten für ihre Mitarbeit an der technischen Seite dieser Arbeit.

Zuletzt danke ich allen Probanden, die ihr Blut freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

